BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE.
Extrait du Tome 50, n° 10, 1968, p. 1583.

Printed in France.

LES RIBOSOMES D'*ESCHERICHIA COLI*. III — ÉTUDE DE LA DISSOCIATION RÉVERSIBLE DU RNA 5S PAR LE CHLORURE DE LITHIUM.

par M. Reynier et R. Monier.

Centre de Biochimie et de Biologie Moléculaire, C.N.R.S., Marseille.

(Mémoire reçu le 19 avril 1968).

Résumé. — Les ribosomes 70S et les sous-unités 50S d'*Escherichia coli* ne présentent pas d'affinité pour le RNA 5S dans des conditions qui leur permettent de fixer le t-RNA sur un site d'échange. Le détachement du RNA 5S, qui accompagne celui d'une fraction des protéines ribosomiques au cours du traitement des ribosomes par LiCl 2 M, est réversible par dialyse contre un milieu de reconstitution (tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,6, $MgCl_2$ 10^{-2} M, KCl 0,1 M). Au cours de la reconstitution, le RNA 5S se fixe sur un site unique de la particule reconstituée correspondant aux sous-unités 50S initiales (particule 48S). Le t-RNA non chargé d'aminoacides n'a pas d'affinité pour ce site. Les particules 48S ne présentent pas de site d'échange pour le t-RNA mais peuvent le récupérer par incubation ultérieure à 37° en présence de mercaptoéthanol. Une fraction des protéines détachées par LiCl 2 M est indispensable à la reconstitution du site de fixation du RNA 5S.

La présence d'une molécule d'un RNA, dont la constante de sédimentation est voisine de 5S, sur la sous-unité 50S des ribosomes d'*Escherichia coli* a été précédemment démontrée [1]. La structure primaire de ce RNA a été complètement établie par Brownlee et coll. [2]. Un RNA de propriétés semblables a été retrouvé par divers auteurs dans les ribosomes de nombreux organismes [3-12] et l'on est en droit de conclure que le RNA 5S est un constituant universel et permanent des ribosomes. Il est, dès lors, certain que ce RNA doit jouer un rôle spécifique dans la structure et l'activité de ces particules. Ce rôle n'a cependant pas encore été déterminé, probablement parce que le RNA 5S est fermement attaché à la

Ce mémoire décrit une partie du travail effectué par Monsieur M. REYNIER en vue de la soutenance d'une Thèse de Doctorat ès-Sciences Physiques, soutenue en 1970 à la Faculté des Sciences de Marseille et enregistrée au CNRS sous le n° A.O. 2914.

structure ribosomique et qu'il est par conséquent difficile de définir un système dont l'activité biosynthétique pourrait dépendre de l'addition de RNA 5S. A cet égard, le problème posé par le rôle du RNA 5S ressemble beaucoup à celui que pose le rôle des protéines ribosomiques dans la structure et les fonctions des ribosomes. Récemment, des techniques permettant de dissocier réversiblement et spécifiquement certaines protéines ribosomiques ont pu être utilisées et leur exploitation commence à apporter des renseignements précis sur le rôle de certaines des fractions protéiques du ribosome [13-16]. On peut se proposer d'utiliser une approche semblable pour essayer de définir le rôle du RNA 5S. Un travail précédent a permis de montrer que le traitement des ribosomes d'*Escherichia coli* par le chlorure de lithium 2 M dans des conditions rigoureusement contrôlées détache environ 50 p. 100 des protéines en même temps que la plus grande partie du RNA 5S [17]. Dans la présente communication nous nous proposons de décrire la réversibilité de ce détachement. L'étude des conditions de réassociation nous a amenés à la conclusion qu'il existe sur la sous-unité 50S un seul site spécifique d'association du RNA 5S. Le t-RNA non chargé d'aminoacides n'a pas d'affinité pour ce site, à la constitution duquel participe une fraction des protéines détachées par le LiCl 2 M.

Partie expérimentale.

Souches bactériennes et conditions de culture.

Dans toutes les expériences décrites, les ribosomes provenaient de cellules de la souche RNase I^-_{10} d'*E. coli*. Dans la plupart des cas, les RNAs utilisés provenaient également de cette souche. Dans quelques expériences, le RNA 5S était extrait de cellules de la souche ML 308. Les conditions de culture, de récolte et de conservation ont été précédemment décrites [17].

Préparation des ribosomes, des particules Li, des surnageants Li et des RNAs.

La préparation des ribosomes ainsi que leur traitement par LiCl 2 M et la séparation par sédimentation des particules obtenues (particules Li) et des protéines solubilisées (surnageants Li) sont effectués dans les conditions décrites par Marcot-Queiroz et Monier [17]. Dans un cas, la préparation des particules Li a été réalisée dans les conditions d'Atsmon et coll. [18], en sédimentant les particules Li aussitôt après la mise en suspension des ribosomes dans LiCl 2 M.

Les RNAs 5S et le t-RNA (*) ont été préparés à partir de cellules intactes conservées à —10° et extraites par mise en suspension rapide à l'aide d'un mixer Turmix dans 1 volume de tampon acétate de sodium 10^{-2} M, pH 5, acétate de magnésium 10^{-2} M, en présence de 1,1 volume

(*) *Abréviation :* t-RNA = acide ribonucléique de transfert.

UNIV. LEIDEN BIBL.

d'une solution aqueuse de phénol à 90 p. 100 en poids et de 0,1 volume d'une suspension à 2,5 p. 100 en poids de Macaloïd (American Tansul Co., Baroïd Division National Lead Co., Houston, Texas).

La purification des RNAs extraits et leur fractionnement ont été décrits précédemment [19]. La déprotéinisation des RNAs et leur récupération à partir de particules Li, de surnageant Li ou d'extraits cellulaires bruts ont été effectuées dans les conditions décrites par MARCOT-QUEIROZ et MONIER [17].

Techniques de marquages des ribosomes et des RNAs.

Pour la préparation de ribosomes marqués par ^{32}P, des cellules de la souche RNAase I^-_{10} sont cultivées à 30° sur un milieu type 68 [20] renfermant du glucose (0,4 p. 100) et du $^{32}PO_4HNa_2$ (2 mC/l — ^{32}P-phosphate isotonique neutre sans entraîneur — CEA) jusqu'à épuisement du P_i du milieu. La culture est alors diluée par 2 volumes de milieu type 63 [20] renfermant du glucose (0,4 p. 100) préchauffé à 30° et les cellules sont récoltées après 2 générations sur le nouveau milieu. Dans ces conditions, seuls les RNAs métaboliquement stables sont marqués par ^{32}P. Le surnageant de préparation des ribosomes-^{32}P a servi à la préparation du ^{32}P-t-RNA utilisé dans quelques expériences.

Le RNA 5S le t-RNA marqués par le ^{14}C-uracile ont été préparés à partir de cultures de la souche RNase I^-_{10} réalisées sur milieu type 63 [20], renfermant 0,4 p. 100 de glucose et du 2-^{14}C-uracile (CEA) (500 µC/l). Les cellules sont toujours récoltées environ 1 génération après épuisement du ^{14}C-uracile dans le milieu.

Reconstitution de particules 48S et 28S à partir des particules Li.

Sauf indications contraires, les particules Li ont été resuspendues dans leur propre surnageant Li et le mélange a été dialysé 24 h contre un milieu de reconstitution renfermant KCl 0,1 M, $MgCl_2$ 10^{-2} M, tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,6 [17].

Oxydation periodique du RNA 5S. — L'oxydation periodique de l'extrémité 3'-OH du RNA 5S a été réalisée dans les conditions précédemment décrites [21].

Attachement du t-RNA et du RNA 5S sur les ribosomes.

Les ribosomes ont été resuspendus dans le milieu utilisé par CANNON et coll. [22] (tris-HCl, 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-2} M). Après addition de la quantité convenable de ^{14}C-t-RNA ou de ^{14}C-RNA 5S, les mélanges sont conservés 30 min à 0° avant analyse par sédimentation en gradient de saccharose.

Sédimentation en gradients de saccharose.

Les sédimentations sur des gradients linéaires de saccharose (5-20 p. 100) ont été effectuées dans une ultracentrifugeuse Spinco L2-50 à une

température de 1°, en utilisant un rotor SW 25-1 à 23 000 t/min pendant 15 h. Le fractionnement des gradients et l'analyse des fractions ont été décrits précédemment [23].

Analyses chromatographiques. — Les chromatographies sur Sephadex G 100 et sur sérumalbumine méthylée ont été réalisées selon des techniques déjà décrites [19, 21].

Résultats.

Attachement du t-RNA et du RNA 5S sur des ribosomes intacts.

Cannon et coll. [22] ont montré que le t-RNA non chargé d'aminoacides peut se fixer sur les ribosomes au niveau de la sous-unité 50S dans des milieux renfermant une concentration élevée en ions Mg^{++}. En

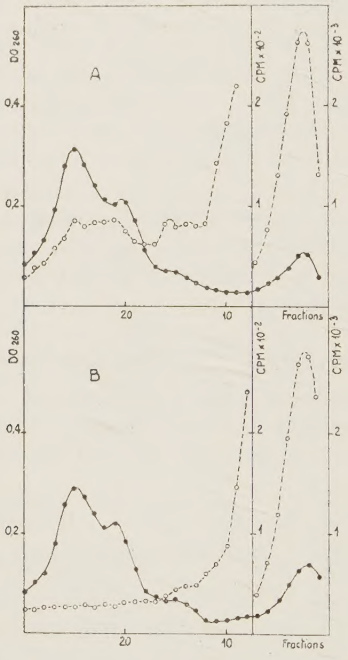


Fig. 1. — *Fixation du t-RNA et du RNA 5S sur les ribosomes.*

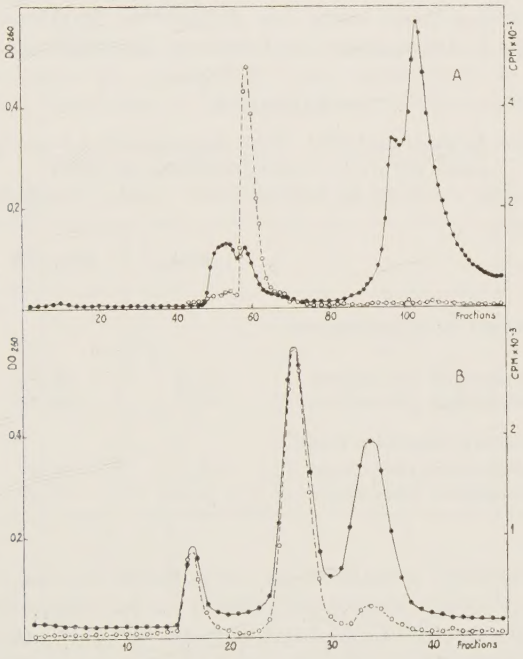
Le mélange réactionnel renferme dans 1 ml de tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,3, $MgCl_2$ 10^{-2} M ; ribosomes, 800 µg et ^{14}C-t-RNA, 40 µg — 2435 CPM (A) ou ^{14}C-RNA 5S, 57 µg — 9140 CPM. Après 30 min d'incubation à 0°, on analyse sur des gradients de saccharose préparés dans le même milieu.
—●——●—: densité optique à 260 mµ ; --o----o--: Radioactivité.

utilisant leurs conditions expérimentales, nous avons vérifié que l'addition de t-RNA radioactif à des ribosomes dans un rapport moléculaire égal à 5 permet l'attachement sur les ribosomes 70S et les sous-unités 50S

présentes dans nos préparations d'une partie du t-RNA radioactif. La mesure de la radioactivité et des densités optiques permet de calculer qu'une molécule de t-RNA par sous-unité 50S ou par ribosome reste associée à ces structures après sédimentation en gradient de saccharose (fig. 1, A). Dans les mêmes conditions, le RNA 5S lui-même ne présente aucune association avec les ribosomes ou les sous-unités 50S (fig. 1, B). On peut conclure de ces résultats que, dans ces conditions expérimentales, le site de fixation du RNA 5S sur la sous-unité 50S d'*E. coli* ne se comporte pas comme un site d'échange, à la différence du site de fixation du t-RNA [22]. En outre, les ribosomes intacts ne possèdent pas dans ces conditions un site supplémentaire permettant l'attachement d'une nouvelle molécule de RNA 5S.

Réassociation du RNA 5S au cours de la reconstitution des particules Li.

Il a été précédemment démontré que, lorsque des particules Li sont mises en suspension dans leur propre surnageant, puis dialysées contre



F(G. 2. — *Analyse chromatographique du surnageant Li préparé à partir de ribosomes marqués par 32P.*

A : Un échantillon de RNA total d'*E. coli* (1,7 mg) a été additionné d'une dose traceuse de surnageant Li marqué par 32P (40 000 CPM) et analysé sur colonne de sérumalbumine méthylée. Volume des fractions : 3 ml.

B : Un mélange de RNA 5S (170 µg) et de t-RNA (154 µg), renfermant du bleu de dextrane Pharmacia, a été additionné d'une dose traceuse de surnageant Li marqué par 32P (11 800 CPM) et filtré sur une colonne de Sephadex G 100 (87 cm × 1,5 cm) équilibré avec LiCl 2 M, tris-HCl $2{,}5.10^{-2}$ M, pH 7,6, $MgCl_2$ 5.10^{-6} M. Volume des fractions : 2,5 ml.

—●——●—: Densité optique à 260 mµ ; --o----o--: Radioactivité.

un tampon tri-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,6, renfermant KCl 0,1 M et $MgCl_2$ 10^{-2} M (milieu de reconstitution), les protéines détachées par LiCl 2 M se réassocient quantitativement aux particules Li pour donner des particules reconstituées dont les coefficients de sédimentation sont voisins de 28S et de 48S [17]. Afin d'étudier le sort du RNA 5S au cours de cette reconstitution, des ribosomes ont été préparés à partir de cellules marquées par ^{32}P dans leurs RNAs métaboliquement stables. Après traitement des ribosomes par LiCl 2 M et séparation des particules et du surnageant par sédimentation, la distribution de la radioactivité du surnageant entre les différentes fractions de RNA qu'il contient a été déterminée par chromatographie sur sérumalbumine méthylée (fig. 2, A) et sur Sephadex G 100 (fig. 2, B) après addition de RNAs entraîneurs convenables. En accord avec les résultats précédemment obtenus [17], la majorité de la radioactivité est retrouvée dans un produit ayant les propriétés chromatographiques du RNA 5S (pic de la fraction 60 dans la fig. 2, A ; pic de la fraction 27 dans la fig. 2, B). On trouve aussi de faibles quantités de t-RNA et de RNAs ribosomiques lourds et la distribution de la radioactivité entre ces différentes fractions est indiquée dans le Tableau I. Les mêmes analyses ont été répétées après déprotéinisation phénolique préalable des surnageants et ont conduit à des résultats pratiquement identiques (Tableau I). La composition en RNAs présents dans les particules Li marquées au ^{32}P a été également déterminée après déprotéinisation phénolique et chromatographie sur sérumalbumine méthylée et comparée à celle des ribosomes de départ. Les résultats obtenus (Tableau II), en bon accord avec ceux publiés précédemment [17] confirment que 70 p. 100 du RNA 5S sont détachés des ribosomes par le traitement au LiCl 2 M.

TABLEAU I.

Répartition de la radioactivité d'un surnageant Li marqué par ^{32}P entre les différentes fractions de RNA (en pour cent de la radioactivité totale récupérée).

	t-RNA	RNA 5 S	RNA 16 S + RNA 23 S
1. Analyse sur colonne de séumralbumine méthylée.			
Avant déprotéinisation phénolique..	10,5	73,0	16,5
Après déprotéinisation phénolique..	6,8	66,0	23,0
2. Analyse sur colonne de Sephadex G 100.			
Avant déprotéinisation phénolique..	9,5	74,0	16,5
Après déprotéinisation phénolique..	9,0	77,5	13,5

A titre de comparaison, la composition en RNA des particules Li obtenues dans les conditions utilisées par ATSMON et coll. [18] a été dé-

terminée (Tableau II). On voit que les conditions de ces auteurs, qui diffèrent des nôtres par la durée d'exposition des ribosomes au LiCl 2 M, ne permettent pas un détachement efficace du RNA 5S.

TABLEAU II.

Composition en RNAs de ribosomes et de particules Li (en pour cent).

	RNA 16 S + RNA 23 S	t-RNA + RNA 5 S
Ribosomes	95,5	4,2
Particules Li préparées selon ATSMON et coll. [18]	97,9	2,1
Particules Li préparées selon MARCOT-QUEIROZ et MONIER [17]	99,3	0,7

Analyse effectuée sur colonne de sérumalbumine méthylée après déprotéinisation phénolique.

La présence de ^{32}P-RNA 5S dans le surnageant des particules Li marquées au ^{32}P ayant été démontrée, une expérience de reconstitution portant sur des particules Li non radioactives resuspendues dans leur

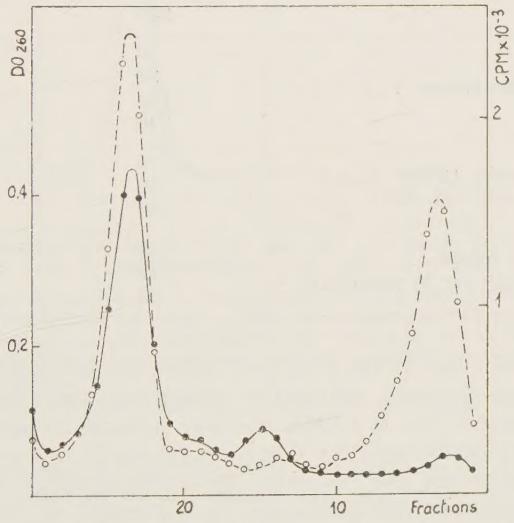


FIG. 3. — *Incorporation de la radioactivité d'un surnageant Li marqué par ^{32}P dans les particules formées au cours de la reconstitution des particules Li.*

Une suspension de particules Li resuspendues dans leur propre surnageant Li (0,5 ml, densité optique à 260 mμ = 33,5) et renfermant 31 μg de polyvinylsulfate et une dose traceuse de surnageant Li marqué par ^{32}P (25 000 CPM) est dialysée pendant 24 h contre le milieu de reconstitution (KCl 0,1 M, $MgCl_2$ 10^{-2} M, tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,6) puis analysée sur gradient de saccharose préparé dans le même milieu.

—●——●—: Densité optique à 260 mμ ; --o----o--: Radioactivité.

propre surnageant et additionnées d'une dose traceuse de surnageant marqué a été effectuée. L'analyse sur gradient de saccharose montre que 50 p. 100 environ de la radioactivité s'associe spécifiquement avec la particule 48S reconstituée (fig. 3). Afin de préciser la nature du RNA ainsi réincorporé, des expériences identiques ont été réalisées en ajoutant au mélange de reconstitution soit du RNA 5S non radioactif soit du t-RNA non radioactif. L'addition de RNA 5S produit une diminution de la radioactivité incorporée proportionnelle à la quantité de RNA 5S ajoutée, tandis que celle de t-RNA, même en quantité importante, n'entraîne pas de diminution (Tableau III).

TABLEAU III.

Effet de l'addition de divers RNAs non radioactifs sur l'incorporation de la radioactivité d'un surnageant Li marqué par ^{32}P dans les particules 48S reconstituées.

Nature du RNA non radioactif ajouté	Quantité de RNA non radioactif ajouté (µg)	Radioactivité spécifique de la particule 48 S (CPM/DO 260 mµ)
RNA 5 S (souche RNase I^-_{10})	0	184
	50	86
	250	16
t-RNA (souche RNase I^-_{10})	0	134
	34	141
	165	150
	340	138
RNA 5 S (souche RNase I^-_{10}) RNA 5 S (souche ML 308)	0	174
	50	102
	50	93
RNA 5 S non oxydé RNA 5 S oxydé par le periodate	0	132
	92	13
	92	34

Il apparaît donc que le RNA 5S non radioactif se comporte comme un compétiteur des produits radioactifs incorporés dans la particule 48S reconstituée, tandis que le t-RNA n'exerce aucune compétition. Compte tenu de la composition en RNA des surnageants Li marqués (Tableau I), on peut donc conclure que l'essentiel de la radioactivité incorporée pendant la reconstitution des particules Li appartient au RNA 5S présent dans le surnageant radioactif et que le t-RNA n'a pas d'affinité pour le site sur lequel se fixe le RNA 5S. D'autre part, la réassociation du RNA 5S ne présente pas de spécificité de souche, puisque les RNAs préparés à partir des souches RNase I^-_{10} et ML 308 sont également compétitifs (Tableau III).

Enfin une expérience semblable aux précédentes a été réalisée en utilisant un RNA 5S de souche RNase I^-_{10} préalablement oxydé par le

periodate. Le RNA oxydé se révèle un compétiteur à peu près équivalent au RNA non oxydé (Tableau III). Donc la réassociation du RNA 5S sur les particules reconstituées n'exige pas l'intégrité de l'extrémité 3'-OH de la molécule, à la différence de ce qu'ont observé CANNON et coll. [22] dans le cas de l'association du t-RNA avec la sous-unité 50S.

Afin de confirmer l'association du RNA 5S aux particules 48S reconstituées, du RNA 5S marqué par le ^{14}C-uracile a été ajouté en quantité équimoléculaire à des particules Li non radioactives resuspendues dans leur propre surnageant et le mélange a été dialysé contre le milieu de reconstitution. L'analyse sur gradient de saccharose révèle qu'il y a bien dans ces conditions incorporation de ^{14}C-RNA 5S dans la particule 48S (fig. 4).

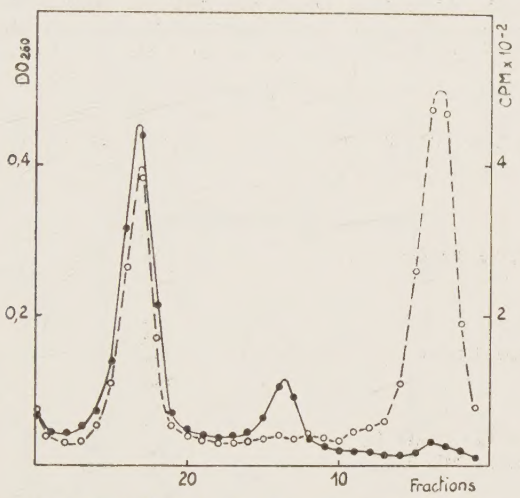


FIG. 4. — *Fixation de ^{14}C-RNA 5S sur les particules formées au cours de la reconstitution des particules Li.*

Une suspension de particules Li resuspendues dans leur propre surnageant Li (0,5 ml, densité optique à 260 mμ = 50,6) et renfermant 46 μg de ^{14}C-RNA 5S (5740 CPM) et 50 μg de polyvinylsulfate est dialysée pendant 24 h contre le milieu de reconstitution puis analysée sur un gradient de saccharose préparé dans le même milieu.

—●——●—: Densité optique à 260 mμ ; --o----o--: Radioactivité.

Cette incorporation ne peut avoir lieu qu'au cours de la reconstitution. En effet si du ^{14}C-RNA 5S est ajouté aux particules déjà reconstituées, aucune incorporation n'est observée (fig. 5, A). Les particules 48S reconstituées se comportent donc à cet égard comme les sous-unités 50S intactes (fig. 1, B). D'autre part, du ^{14}C-RNA 5S a été ajouté à des particules Li resuspendues dans un milieu tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,6, $MgCl_2$ 10^{-4} M et le mélange a été dialysé contre le milieu de reconstitution. Dans ces conditions, les particules Li conservent des coefficients de sédimentation de l'ordre de 19S et 27S et aucune association du ^{14}C-RNA 5S

ne peut être démontrée (fig. 5, B). Donc la présence pendant la reconstitution des protéines détachées des ribosomes par le traitement au LiCl 2 M est indispensable à la fois pour transformer les particules Li en particules 28S et 48S et pour assurer la fixation du RNA 5S sur la particule 48S.

En accord avec le fait signalé plus haut que le t-RNA non radioactif n'exerce aucune compétition vis-à-vis de l'incorporation de la radioactivité des surnageants Li marqués dans les particules 48S reconstituées

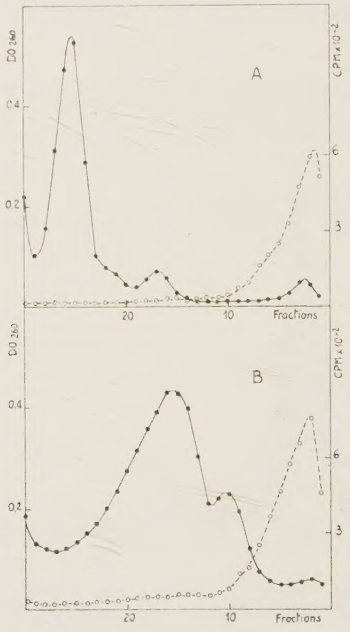


FIG. 5. — A : Une suspension de particules Li resuspendues dans leur propre surnageant Li (0,5 ml, densité optique à 260 mμ = 55,5) et renfermant 50 μg de polyvinylsulfate est dialysée pendant 15 h contre le milieu de reconstitution. On ajoute alors 10 μl d'une solution de ^{14}C-RNA 5S correspondant à 30 μg et 4750 CPM et on poursuit la dialyse pendant 9 h avant d'analyser sur un gradient de saccharose préparé dans le milieu de reconstitution.

B : Une suspension de particules Li resuspendues dans $MgCl_2$ 10^{-4} M, tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,6 (0,5 ml, densité optique à 260 mμ = 55) et renfermant 50 μg de polyvinylsulfate et 30 μg de ^{14}C-RNA 5S (4750 CPM) est dialysée pendant 24 h contre le milieu de reconstitution puis analysée sur un gradient de saccharose préparé dans le même milieu.

—●——●—: Densité optique à 260 mμ ; --o----o--: Radioactivité.

(Tableau III), l'addition d'une quantité équimoléculaire de t-RNA radioactif à des particules en cours de reconstitution n'est suivie d'aucune incorporation de radioactivité dans les particules 48S (fig. 6).

Restauration de la fixation du t-RNA sur les particules 48S par traitement au mercaptoéthanol à 37°.

Le t-RNA ne présente donc aucune affinité pour les particules 48S dans les expériences de reconstitution. Cependant le milieu de reconstitution utilisé renferme des ions K^+ à la concentration 0,1 M et, puisque Cannon [24] a montré récemment que l'ion K^+ exerce un effet inhibiteur sur la fixation du t-RNA sur la sous-unité 50S, il était nécessaire d'étudier l'affinité du t-RNA pour les particules 48S en l'absence d'ions K^+. Après reconstitution, les particules ont donc été dialysées contre le milieu utilisé précédemment par Cannon et coll. [22] (tampon tris-HCl, 5.10^{-3} M, pH 7,4, $MgCl_2$ 10^{-2} M). L'addition à ces particules de t-RNA radioactif dans un rapport moléculaire de 5 n'est pas suivie de son association à la particule 48S. Les particules 48S, quoiqu'elles aient la même composition globale en protéines que les sous-unités 50S [17], n'ont pas récupéré toutes les

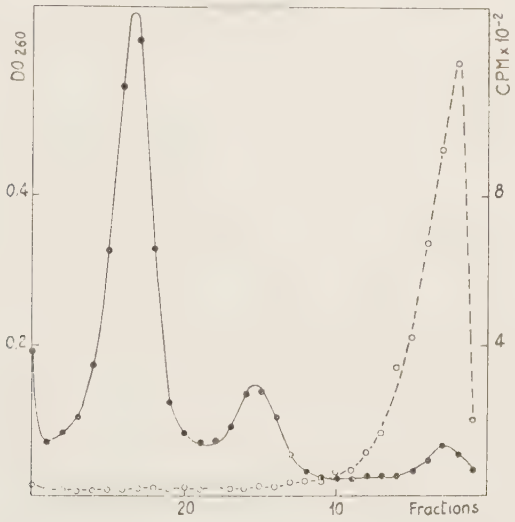


Fig. 6. — *Essai de fixation de t-RNA radioactif sur les particules formées au cours de la reconstitution des particules Li.*

Une suspension de particules Li resuspendues dans leur propre surnageant Li (0,5 ml, densité optique à 260 mμ = 45,3) et renfermant 37 μg de polyvinylsulfate et 25 μg de ^{32}P-t-RNA (8760 CPM) est dialysée pendant 24 h contre le milieu de reconstitution et analysée sur un gradient de saccharose préparé dans le même milieu.

-●—●—: Densité optique à 260 mμ ; --o----o--: Radioactivité.

propriétés de ces sous-unités, et en particulier, celle de fixer le t-RNA. Cette propriété réapparaît néanmoins lorsque les particules reconstituées sont incubées pendant 1 h à 37° dans le milieu de Cannon et coll. [22] additionné de mercaptoéthanol 6.10^{-3} M [25]. On observe d'une part la formation d'une particule d'un coefficient de sédimentation voisin de

80S, sans affinité pour le t-RNA, et la fixation de t-RNA radioactif sur la particule 48S qui subsiste (fig. 7, A). L'affinité des particules pour le RNA 5S reste nulle dans ces conditions (fig. 7, B).

Influence de la concentration en Mg^{++} sur la réassociation du RNA 5S au cours de la reconstitution des particules Li.

Toutes les expériences de reconstitution précédentes ont été faites en dialysant contre un milieu de reconstitution renfermant des ions Mg^{++} à la concentration 10^{-2} M. Si cette concentration est abaissée, on observe

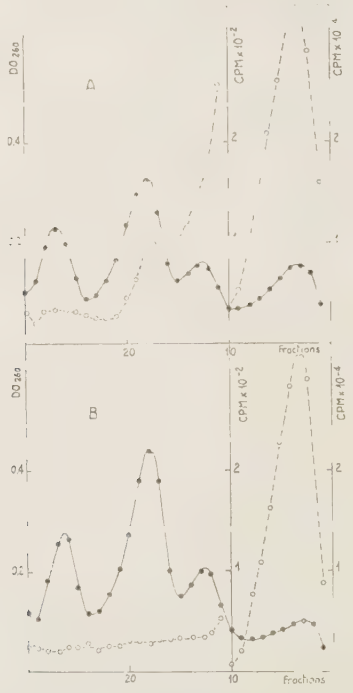


Fig. 7. — *Fixation de t-RNA et de RNA 5S sur les particules reconstituées après traitement par le mercaptoéthanol à 37°.*

Deux suspensions de particules Li resuspendues dans leur propre surnageant Li (0,5 ml, densité optique à 260 mμ = 55,5) et renfermant 50 μg de PVS sont dialysées pendant 16 h contre le milieu de reconstitution puis pendant 8 h contre tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,6, $MgCl_2$ 10^{-2} M. On ajoute alors du mercaptoéthanol jusqu'à une concentration de 6.10^{-3} M et on incube 60 min à 37°. Après refroidissement à 0°, une suspension (A) reçoit 83 μg de ^{14}C-t-RNA (25 000 CPM), la deuxième (B) reçoit 154 μg de ^{14}C-RNA 5S (25 000 CPM). Les deux suspensions sont incubées à 0° pendant 30 min puis analysées sur des gradients de saccharose préparés dans tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,6, $MgCl_2$ 10^{-2} M.
—●——●—: Densité optique à 260 mμ ; --o----o--: Radioactivité.

d'une part que le coefficient de sédimentation des particules reconstituées est plus faible et d'autre part que l'incorporation de la radioactivité d'un surnageant de particules Li marqué par 32 P ajouté comme mar-

queur diminue. La fraction de la radioactivité totale incorporée dans la particule 48S, qui est de 50 p. 100 pour la concentration 10^{-2} M, passe à 25 p. 100 pour 10^{-3} M et n'est plus que de 10 p. 100 pour 10^{-4} M

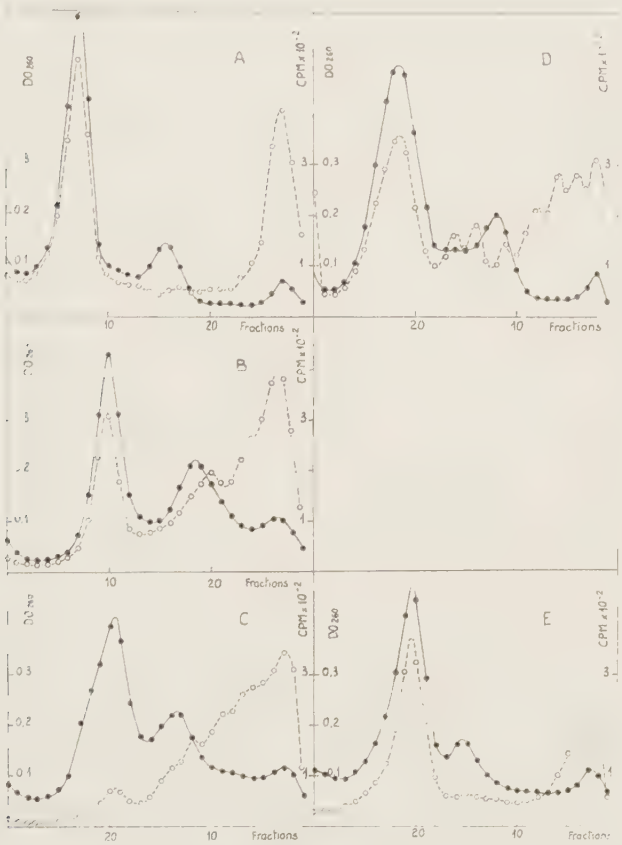


FIG. 8. — *Influence de la concentration en ions Mg^{++} sur la reconstitution des particules Li et la fixation du RNA 5S sur les particules reconstituées.*

Des suspensions de particules Li resuspendues dans leur propre surnageant Li (0,5 ml, densité optique à 260 mμ = 37,4) et additionnées de 37 μg de polyvinylsulfate et d'une dose traceuse d'un surnageant Li marqué par ^{32}P (25 000 CPM) sont dialysées contre des milieux renfermant tous KCl 0,1 M, tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,6 et des concentrations variables de $MgCl_2$.

A = 24 h de dialyse - $MgCl_2$ 10^{-2} M
B = 24 h de dialyse - $MgCl_2$ 10^{-3} M
C = 24 h de dialyse - $MgCl_2$ 10^{-4} M
D = 1re dialyse de 15 h - $MgCl_2$ 10^{-2} M. 2e dialyse de 9 h - $MgCl_2$ 10^{-4} M.
E = 1re dialyse de 15 h - $MgCl_2$ 10^{-4} M. 2e dialyse de 9 h - $MgCl_2$ 10^{-2} M.
--●——●—: Densité optique à 260 mμ ; --o----o--: Radioactivité.

(fig. 8, A, B, C). Si après une première dialyse contre un milieu 10^{-4} M en ions Mg^{++}, on effectue une seconde dialyse contre un milieu 10^{-2} M, cette fraction devient égale à 49 p. 100 (fig. 8, E).

Lorsqu'après une première dialyse contre un milieu 10^{-2} M en ions Mg^{++}, on dialyse une seconde fois contre un milieu 10^{-4} M, la plus grande partie de la radioactivité incorporée au cours de la première dialyse reste fixée à la particule 48S au cours de la seconde puisqu'on retrouve dans ces conditions 39 p. 100 de la radioactivité totale dans la particule (fig. 8, D).

La concentration en ions Mg^{++} pendant la reconstitution doit donc être au moins égale à 10^{-2} M pour assurer une bonne réassociation du RNA 5S sur la particule 48S. Une fois cette réassociation réalisée, la plus grande partie du RNA 5S réassociée n'est pas détachée de la particule lorsqu'on passe dans un milieu à faible concentration en ions Mg^{++}. La réassociation observée est complètement différente à cet égard de la fixation du t-RNA sur la sous-unité 50S, puisque cette fixation qui a lieu également en présence de concentrations élevées en ions Mg^{++} est complétement réversible lorsque la concentration est réduite à 10^{-4} M [22].

Influence de la concentration en protéines du surnageant Li sur la réassociation du RNA 5S sur la particule 48S.

L'expérience décrite dans la fig. 5, B démontrait que les protéines détachées des ribosomes par le traitement au LiCl 2 M sont indispensables à la réassociation du RNA 5S sur les particules. Afin de préciser ce point, plusieurs séries d'expériences ont été faites en ajoutant à une quantité constante de particules Li resuspendues dans un milieu LiCl 2 M, $MgCl_2$ 5.10^{-6} M, tris-HCl $2{,}5.10^{-3}$ M, pH 7,6 des quantités croissantes de surnageant Li, une quantité constante de ^{14}C-RNA 5S et des quantités variables de ^{12}C-RNA 5S, de façon à réaliser une concentration constante en RNA 5S total, compte-tenu du RNA 5S apporté par le surnageant Li. Les échantillons obtenus, ajustés à un volume constant par addition de milieu de suspension des particules, ont été dialysés contre le milieu de reconstitution puis analysés sur gradient de saccharose. La fig. 9 (A et B) présente à titre d'exemples les résultats de ces analyses pour deux des doses de surnageant Li utilisées. On observe déjà (fig. 9, A) la formation de particules d'un coefficient de sédimentation voisin de 48S pour une dose qui correspond à la moitié des protéines qui ont été perdues par les ribosomes au cours du traitement par LiCl 2 M. Ces particules 48S sont accompagnées de particules 28S et de particules ayant un coefficient de sédimentation intermédiaire. Ces dernières disparaissent progressivement lorsque la dose de protéines augmente et sont complètement éliminées dans l'expérience de la fig. 9, B, dans laquelle la quantité de protéines utilisées correspondait à 3 fois celle des protéines perdues par les ribosomes.

La radioactivité spécifique des particules 48S a été calculée et les résultats exprimés en nombre de molécules de RNA 5S incorporées par particule, en tenant compte de la radioactivité spécifique du RNA 5S utilisé dans chaque échantillon et du RNA 5S présent au départ dans les particules Li. La courbe de la fig. 10 obtenue en portant en abscisses la dose de protéines ajoutée et en ordonnées le nombre de molécules de

RNA 5S par particule 48S montre que ce nombre varie proportionnellement à la quantité de protéines jusqu'à un plateau qui correspond exactement à une molécule de RNA 5S par particule 48S. Dans l'expérience

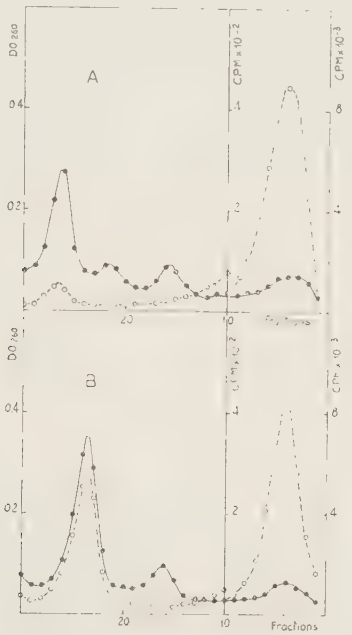


FIG. 9. — *Reconstitution de particules Li en présence de quantités variables de surnageant Li.*

Un culot de particules Li est resuspendu dans une solution de LiCl 2 M, $MgCl_2$ 5.10^{-6} M, tris-HCl $2{,}5.10^{-3}$ M, pH 7,6, dont le volume est égal au 1/4 de celui du surnageant Li correspondant, de telle façon que 0,125 ml de suspension corresponde à 0,5 ml de surnageant Li.

A : Dans un volume total de 2,2 ml de LiCl 2 M, $MgCl_2$ 5.10^{-6} M, tris-HCl $2{,}5.10^{-3}$ M, pH 7,6, le mélange renferme 0,125 ml de la suspension de particules Li, 0,25 ml de surnageant Li, 18 µg de ^{14}C-RNA 5S (16 600 CPM), 60 µg de ^{12}C-RNA 5S et 100 µg de polyvinylsulfate. Rapport surnageant Li/particules Li = 0,5.

B : Dans un volume total de 2,2 ml de LiCl 2 M, $MgCl_2$ 5.10^{-6} M, tris-HCl $2{,}5.10^{-3}$ M, pH 7,6, le mélange renferme 0,125 ml de la suspension de particules Li, 1,5 ml de surnageant Li, 18 µg de ^{14}C-RNA 5S (16 600 CPM), 17 µg de ^{12}C-RNA 5S et 100 µg de polyvinylsulfate. Rapport surnageant Li/particules Li = 3.

Ces deux mélanges sont dialysés 24 h contre le milieu de reconstitution et des aliquots de 0,5 ml sont analysés sur des gradients de saccharose préparés dans le milieu de reconstitution.

—●——●—: Densité optique à 260 mµ ; --o----o--: Radioactivité.

décrite ici, ce plateau n'est atteint que lorsque la quantité de protéines ajoutée correspond à peu près à 2 fois la quantité des protéines perdues par les ribosomes au cours du traitement par LiCl 2 M. La quantité des

protéines nécessaire pour atteindre le plateau varie en fait d'une série d'expériences à l'autre en fonction de la préparation de surnageant Li utilisée et de la durée de sa conservation.

Il semble donc qu'une fraction particulière des protéines détachées des ribosomes par LiCl 2 M joue un rôle spécifique dans la réassociation du RNA 5S. Cette fraction doit être instable dans nos conditions expérimentales, ce qui fait qu'elle est limitante dans les expériences de reconstitution décrites ici.

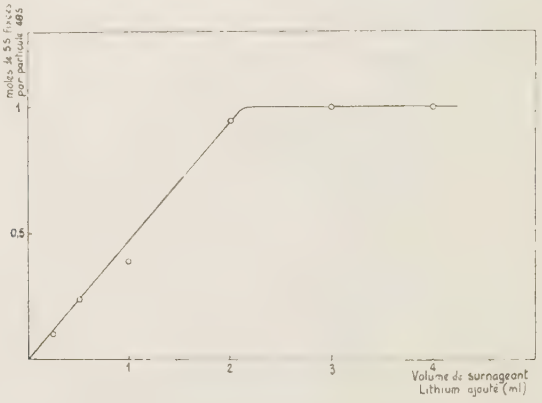


FIG. 10. — *Influence de la concentration en surnageant Li sur la fixation du RNA 5S sur les particules reconstituées.*

Dans un volume total de 2,2 ml, tous les mélanges réactionnels renferment 0,125 ml de la suspension de particules Li définie dans la légende de la fig. 9, des volumes variables de surnageant Li et une quantité constante de RNA 5S obtenue en ajoutant 18 µg de ^{14}C-RNA 5S (16 600 CPM) et une quantité variable de ^{12}C-RNA 5S calculée en tenant compte de la quantité de ^{12}C-RNA 5S renfermée dans le volume de surnageant Li utilisé (Radioactivité spécifique finale du RNA 5S ajouté : 7.500 CPM/mµmole). Après dialyse pendant 24 h contre le milieu de reconstitution, des aliquots de 0,5 ml sont analysés sur des gradients de saccharose préparés dans le milieu de reconstitution. La radioactivité mesurée dans le pic des particules 48S est exprimée en moles de RNA 5S et rapportée au nombre de moles de particules 48S calculé d'après la densité optique à 260 mµ.

DISCUSSION.

Le détachement du RNA 5S des ribosomes d'*E. coli* par exposition au LiCl 2 M est donc un phénomène réversible, de même que le détachement des protéines qui l'accompagne. Les caractères de la réassociation montrent qu'elle suppose la reconstitution d'un site unique et que des protéines solubilisées par LiCl 2 M participent à cette reconstitution. En l'absence de ces protéines on n'observe aucune fixation du RNA 5S sur les particules Li dans des milieux à concentration élevée en ions Mg^{++}. Des expériences récentes [26], dont les détails seront publiés ultérieurement, ont d'ailleurs montré que le RNA 5S forme effectivement un complexe avec une fraction des protéines Li dans le milieu de reconstitution en l'absence de particules.

Le site de fixation du RNA 5S ne présente pas d'affinité décelable dans nos conditions expérimentales pour le t-RNA non chargé d'aminoacides et ne se comporte pas comme un site d'échange. Nos résultats sont donc sur ces deux points en contradiction avec ceux de Comb et Sarkar [27]. Il faut remarquer à cet égard que les observations de ces auteurs portent sur des ribosomes de cellules eucaryotes (*Blastiocladiella emersonii*) et l'on sait que les ribosomes des eucaryotes diffèrent par de nombreuses propriétés des ribosomes des procaryotes. En outre les conditions expérimentales utilisées par Comb et Sarkar [27] s'écartent notablement des nôtres, en particulier par les concentrations en RNA 5S et en t-RNA employées. Alors que nous avons toujours maintenu le rapport moléculaire de ces RNAs aux ribosomes ou aux particules Li en dessous de 10, Comb et Sarkar [27] utilisent des rapports moléculaires qui sont beaucoup plus élevés puisqu'ils atteignent 100 à 200. Il est probable que ces différences dans le matériel et les méthodes sont à l'origine du désaccord entre les résultats obtenus.

Le présent travail a bénéficié en particulier de l'aide du Fonds de Développement de la D.G.R.S.T. et du Commissariat à l'Energie Atomique.

Summary

70S ribosomes and 50S sub-units from *Escherichia coli* have no affinity for 5S RNA under conditions which permit the binding of t-RNA on an exchange site. The liberation of 5S RNA, which follows the liberation of ribosomal proteins during exposure of the ribosomes to 2 M LiCl, is reversible upon dialysis against a reconstitution medium containing tris-HCl 5.10^{-3} M, pH 7,6, $MgCl_2$ 10^{-2} M, KCl 6,1 M. During the reconstitution 5S RNA is bound to only one site on the reconstituted particle which corresponds to the initial 50S subunit (48S particle). Uncharged tRNA has no affinity for this site. 48S particle have no exchange site for tRNA but can recover it by further incubation at 37° in the presence of mercaptoethanol. A fraction of the proteins solubilized by 2 M LiCl is necessary for the reconstitution of the 5S RNA binding site.

Zusammenfassung.

Die 70 S -Ribosomen und 50 S -Untereinheiten von *Escherichia coli* weisen unter Bedingungen, die ihnen die Bindung der tRNS an ein Austausch-Zentrum erlauben, keine Affinität für die RNS 5S auf. Das Lostrennen vom 5S RNS, welches dasjenige einer Fraktion von Ribosomen-Proteinen im Laufe der Behandlung der Ribosomen durch 2 M LiCl begleitet, ist durch Dialyse gegen ein Wiederherstellungsmedium(Tris-HCl 5.10^{-3}M, pH 7,6, $MgCl_2$ 10^{-2}M, KCl 0,1 M) umkehrbar. Im Laufe der Wiederherstellung bindet sich die RNS 5S an ein einziges Zentrum der den ursprünglichen 50 S-Untereinheiten (48S-Partikel) entsprechenden wiederhergestellten Partikel. Die mit keinen Aminosäuren geladene tRNS hat keine Affinität für dieses Zentrum. Die 48S-Partikeln weisen für die tRNS kein Austausch-Zentrum auf, können es aber durch nachträgliche Inkubation bei 37°C in Gegenwart von Merkaptoäthanol wiederfinden. Eine Fraktion der durch LiCl 2 M losgelösten Proteine ist zur Wiederherstellung des Bindungszentrums der RNS 5S unentbehrlich.

BIBLIOGRAPHIE

1. Rosset, R., Monier, R. et Julien, J. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1964, **46**, 87.
2. Brownlee, G. G., Sanger, F. et Barrel, B. G. — *Nature*, 1967, **215**, 735.

3. Comb, D. G., Sarkar, N., Devallet, J. et Pinzino, C. J. — *J. Mol. Biol.*, 1965, **8**, 509.
4. Marcot-Queiroz, J., Julien, J., Rosset, R. et Monier, R. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1965, **47**, 183.
5. Galibert, F., Larsen, C. J., Lelong, J. C. et Boiron, M. — *Nature*, 1965, **207**, 1039.
6. Bachvaroff, R. J. et Tongur, V. — *Nature*, 1966, **211**, 248.
7. Brown, D. D. et Littna, E. — *J. Mol. Biol.*, 1966, **20**, 95.
8. Forget, B. G. et Weissman, S. M. — *Nature*, 1966, **313**, 878.
9. Hayward, R. S., Legault-Demare, J. et Weiss, S. B. — *Fed. Proc.*, 1966, **25**, 520.
10. Jackson, R. J. — *Biochem. J.*, 1966, **100**, 77 p.
11. Marcot-Queiroz, J., Rosset, R. et Monier, R. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1966, **48**, 37.
12. Morell, P., Smith, I., Dubnau, D. et Marmur, J. — *Biochem.*, 1967, **6**, 258.
13. Traub, P., Hosokawa, K. et Nomura, M. — *J. Mol. Biol.*, 1966, **19**, 215.
14. Staehelin, T. et Meselson, M. — *J. Mol. Biol.*, 1966, **15**, 245.
15. Hosokawa, K., Fujimura, R. K. et Nomura, M. — *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 1966, **55**, 198.
16. Raskas, H. et Staehelin, T. — *J. Mol. Biol.*, 1967, **23**, 89.
17. Marcot-Queiroz, J. et Monier, R. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1967, **49**, 477.
18. Atsmon, A., Spitnick-Elson, P. et Elson, D. — Communication personnelle.
19. Reynier, M., Aubert, M. et Monier, R. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1967, **49**, 1205.
20. Cohen, G. N. et Rickenberg, H. N. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 693.
21. Aubert, M., Reynier, M. et Monier, R. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1967, **49**, 1191.
22. Cannon, M., Krug, R. et Gilbert, W. — *J. Mol. Biol.*, 1963, **7**, 360.
23. Julien, J., Rosset, R. et Monier, R. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1967, **49**, 233.
24. Cannon, M. — *Biochem. J.*, 1967, **104**, 934.
25. Tamaoki, T. et Miyazawa, F. — *J. Mol. Biol.*, 1967, **23**, 35.
26. Reynier, M., Jarry, B. et Monier, R. — Résultats non publiés.
27. Comb, D. G. et Sarkar, N. — *J. Mol. Biol.*, 1967, **25**, 317.

IMPRIMERIE M. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.